

=> s ep0337057/pn  
L4 1 EP0337057/PN  
(EP337057/PN)

=> d ab

L4 ANSWER 1 OF 1 WPINDEX (C) 2003 THOMSON DERWENT  
AB DE 3815932 A UPAB: 19971006

Identifying the state of differentiation and the origin of cell tissue samples comprises solubilising any insoluble intermediate filament proteins (IFP) as soluble fragments (pref.alpha-helical central portions (AHCP)), then identification of tissue type by immunological reaction with specific antibodies (Ab).

The Ab used (1) provide an identification, esp. unambiguous, of the IFP according to its origin and (2) moreover react immunologically, in several different test procedures, with AHCP or their epitope-contg. fragments in a standard prepd. by reconstitution from native monomers of each of the relevant IFP.

Also new are (a) hybridoma cell lines deposited as ECACC 88011901, 87111302, 87110601, 87111301 and 87110602 and (b) the IgG2a antibodies produced by these hybridomas (reactive with cytokeratins (CK) 19, CK8, CK18 and vimentin as antigens, respectively).

USE/ADVANTAGE - To classify tumours and, particularly, metastases. The use of a standard allows the procedure to be made quantitative.  
Dwg.0/0

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

**0 337 057  
A1**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 89101074.6

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>: G01N 33/68 , G01N 33/574 ,  
G01N 33/577 , C12P 21/00

(22) Anmeldetag: 23.01.89

Die Bezeichnung der Erfindung wurde geändert  
(Richtlinien für die Prüfung im EPA, A-III, 7.3).

(30) Priorität: 26.01.88 DE 3802093  
10.05.88 DE 3815932

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
18.10.89 Patentblatt 89/42

(64) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: PROGEN Biotechnik GmbH  
Im Neuenheimer Feld 519  
D-6900 Heidelberg(DE)

(72) Erfinder: Bruder, Gerda, Dr.  
Bergheimer Strasse 110A  
D-6900 Heidelberg(DE)  
Erfinder: Franke, Werner Wilhelm, Dr.  
Landfriedstrasse 6  
D-6900 Heidelberg(DE)

(74) Vertreter: Hach, Hans Karl, Dr.  
Tarunstrasse 23  
D-6950 Mosbach-Waldstadt(DE)

(54) Verfahren zur Identifizierung der Ursprungs einer Zell- oder Gewebeprobe.

(57) Zur immunologischen Identifizierung der löslichen alpha-helikalen Mittelstücke von Intermediärfilamentproteinen werden Antikörper eingesetzt, die zur Identifizierung von Intermediärfilamentproteinen nach ihrem Ursprungsgewebetyp geeignet sind und mit durch Rekonstitution aus nativen Monomeren gewonnenen Standards immunologisch reagieren. Die Identifizierung dient zur Auffindung von Gewebsläsionen (Tumornekrosen, Entzündungen und andere pathologische Herde) in lebenden Organismen.

EP 0 337 057 A1

## VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG DES URSPRUNGS EINER ZELLGEBEWESPROBE

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung des Differenzierungszustandes und des Ursprungs einer Zellgewebsprobe oder von Zellgewebstrümmern in Körperflüssigkeit durch Solubilisierung der in dieser Probe beziehungsweise der Körperflüssigkeit vorhandenen unlöslichen Intermediärfilamentproteine in Form von löslichen Fragmenten, vorzugsweise der alpha-helikalen Mittelstücke, und Identifizierung dieser Fragmente nach ihrem Ursprungsgewebetyp durch Immunreaktion mit spezifischen Antikörpern.

Die Lösung kann einmal hergestellt werden aus einem Gewebe, das zu diesem Zweck homogenisiert und mit Protease behandelt wird. Dieses Verfahren kann dazu dienen, Tumore zu klassifizieren und insbesondere Metastasen in einem Gewebe, das einem anderen Typ als das Tumorgewebe angehört, zu identifizieren. Die Lösung kann zum anderen aus einer natürlichen Körperflüssigkeit bestehen, und die darin aufgelundenen IF-Proteine und ihre Fragmente dienen als Nachweis einer vorangegangenen Zellläsion, die zur Freisetzung der im nichtpathologischen Zustand streng intrazellulär lokalisierten IF-Strukturproteine führt. Die Zuordnung für die unten genannten typischen IF-Proteine ist im wesentlichen bekannt und in vereinfachter Form in der folgenden TABELLE 1 dargestellt.

TABELLE 1

Typisches Ursprungsgewebe	Intermediärfilamentprotein
Muskelgewebe	Desmin
Nervengewebe (Neuronenzellen)	Neurofilamentproteine (NF-L, NF-M, NF-H)
Bindegewebe (Mesenchymale Zellen)	Vimentin
Nervengewebe (Astrocyten)	Gliafilamentprotein (auch "saures Gliafilamentprotein" genannt)
Epithelien	Cytokeratine

Der Begriff "Cytokeratine" wird hier benutzt, wie er von Franke et al. (1978) EXP. Cell. Res. 116, 429-445 in der Literatur eingeführt wurde. In WO85/03132 ist eine Methode beschrieben, im Patientenserum enthaltene Cytokeratine serologisch mit bestimmten Antikörpern immunologisch zu identifizieren. Zwei der hauptsächlichen Angaben für solch "extrazelluläres Cytokeratin" in WO85/03132 sind jedoch falsch: Weder ist nur der Aminoterminus der "extrazellulären Cytokeratine" blockiert (die Fachliteratur stimmt für alle bisher analysierten intrazellulären Cytokeratine - wie auch für andere IF-Proteine - überein, daß sie weit überwiegend am Aminoterminus blockiert sind, wobei als Blockierungsgruppe in vielen Fällen ein Acetyl-Rest bestimmt wurde), noch gelangt intaktes Cytokeratin in den extrazellulären Raum, inklusive Serum, auf gar keinen Fall auf dem Wege einer "Sekretion", wie in WO85/03132 beschrieben, da in der Aminosäuresequenz aller bekannter IF-Proteine, speziell der Cytokeratine (die menschlichen Cytokeratine sind aufgeführt bei: Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., and Krepler, R. Cell 31, 11-24, 1982; Quinlan, R.A., Schiller, D.L., Hatzfeld, M., Achtstaetter, T., Moll, R., Jorcano, J.L., Magin, T.M., and Franke, W.W. In: Intermediate Filaments (Wang, E., Fischman, D., Liem, R.K.H., Sun, T.-T., eds.) Vol. 455, The New York Academy of Sciences, New York, pp. 282-306, 1985) alle molekularbiologischen Voraussetzungen für einen Sekretionsprozeß fehlen. Da Cytokeratine im Serum so gut wie unlöslich sind, kann ein serologischer Nachweis nicht auf intakte Cytokeratine - wie in WO85/03132 beschrieben -, sondern nur auf lösliche Bruchstücke der Cytokeratine gerichtet sein. Dazu sind aber in dieser Vorveröffentlichung Angaben, die eine quantifizierbare Bestimmung ermöglichen, nicht gemacht.

Aus Franke, W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 75:5034-5038 (1978); Franke, W., et al., Differentiation 15:7-25 (1979) sowie Bannasch, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4948-4952 (1980) ist ein histologischer, immunologischer Nachweis von Cytokeratinen in normalen und tumorösen Säugetiergeweben bekannt. Den Möglichkeiten histologischer Identifizierung von Tumorgewebe sind enge Grenzen gesetzt, da sie auf den jeweiligen Schnitt begrenzt sind und keine Quantifizierung integraler Art erlauben.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren der eingangs genannten Art zu entwickeln und geeignete Antikörper dafür anzugeben.

Die Erfindung löst diese Aufgabe dadurch, daß als Antikörper solche eingesetzt werden, die zur Identifizierung - vorzugsweise zur eindeutigen Identifizierung - von IF-Proteinen nach ihrem Ursprungsgewebetyp geeignet sind und außerdem nach mehreren verschiedenen bekannten Testverfahren mit dem alpha-helikalen Mittelstück beziehungsweise einem Epitop-tragenden Fragment davon eines durch Rekonstitution aus gereinigten Monomeren des jeweils betreffenden Intermediärfilamentproteins gewonnenen Standards

immunologisch reagieren.

Vorzugsweise wird ein Standard aus den zu identifizierenden Mittelstücken beziehungsweise Epitop-tragenden Fragmenten hergestellt, indem aus dem entsprechenden Gewebe oder einer geeigneten Zellkultur-Linie durch Extraktion und Reinigung die einzelnen Cytoskelett-Polypeptide isoliert werden, dann werden aus diesen Polypeptiden beziehungsweise im Falle der Cytokeratine aus einem äquimolaren Gemisch von Cytokeratin-Polypeptiden der basischen (Typ II) und der sauren (Typ I) Unterfamilien als nächste Untereinheiten Dimere, sodann Tetramere und schließlich Protofilamente gebildet, und dann werden durch kontrollierte Verdauung mit Protease die alpha-helikalen Mittelstücke dieser Intermediärfilamente als Tetramere freigesetzt, isoliert und gereinigt und als Standard eingesetzt.

Die zu untersuchende Probe kann eine Probe aus Zellgewebe sein, es kann sich aber auch um eine Probe aus Körperflüssigkeit handeln, beispielsweise aus Blut, Blutserum, Cerebrospinalliquor, Urin, Fruchtwasser oder Punktaten, wobei dann die in dieser Körperflüssigkeit gelösten Cytoskelettprotein-Fragmente nachgewiesen und bestimmt werden.

Die Solubilisierung der zu identifizierenden Intermediärfilamentproteine erfolgt vorzugsweise bis maximal zur einfachen Teilung der alpha-helikalen Mittelstücke in jeweils zwei Mittelstückfragmente und dadurch, daß solche Antikörper eingesetzt werden, deren Epitope durch die einfache Teilung unbeeinflusst an mindestens einem dieser Mittelstückfragmente sitzen und daß zur Quantifizierung und Identifizierung der alpha-helikalen Mittelstücke die Zahl der diese Epitope aufweisenden Mittelstückfragmente bestimmt wird.

Dabei verfährt man am besten derart, daß die Solubilisierung mit Protease im Enzym-zu-Substrat-Verhältnis und einer Abbaupzeit erfolgt, die derart bemessen ist, daß von allen zu identifizierenden Intermediärfilamentproteinen die alpha-helikalen Mittelstücke beziehungsweise Epitop-tragenden Fragmente davon freigesetzt sind.

Vorzugsweise macht man sich den Umstand zunutze, daß aufgrund der Vorarbeiten und Praktizierung der eingangs erwähnten bekannten histologischen Identifizierung geeignete Antikörper bekannt sind, die zur Identifizierung von IF-Proteinen geeignet sind. Aus diesen Antikörpern können dann durch die gekennzeichneten Maßnahmen solche ausgewählt werden, die für die serologische Identifizierung geeignet sind, und das sind solche, deren Epitop auf dem jeweiligen alpha-helikalen Mittelstück sitzt, das gegenüber weiteren proteolytischen und anderen Abbau-Prozessen relativ stabil ist.

So können zum Beispiel für die häufig vorkommenden Cytokeratine 8, 18 und 19 die folgenden, im Handel erhältlichen Antikörper verwendet werden: CAM 5.2, erhältlich von Becton Dickinson, Mtn. View, CA, USA; K<sub>8</sub>13, erhältlich von Biomakor, Rehovot, Israel; K<sub>8</sub>pan 1-8, erhältlich von PROGEN, Heidelberg, Bundesrepublik Deutschland, und hinterlegt bei der ECACC = EUROPEAN COLLECTION OF ANIMAL CELL CULTURES (PHLS CAMR, Porton Down, Salisbury, Wilts, Großbritannien) unter der Nr. 88011901 (siehe nachfolgende Tabelle 2); CK-2, erhältlich von Boehringer Mannheim, Bundesrepublik Deutschland; K<sub>8</sub>19.2, erhältlich von PROGEN, Heidelberg, Bundesrepublik Deutschland und hinterlegt bei der ECACC unter der Hinterlegungsnummer 87111302. Antikörper K<sub>8</sub>19.2 ist spezifisch für Cytokeratin 19 (siehe nachfolgende Tabelle 3).

Weitere Antikörper, die bei der Anwendung der Erfindung verwendet werden können, sind K<sub>8</sub>8-17.2, ein spezifischer Antikörper für das Cytokeratin 8, hinterlegt bei der ECACC unter der Hinterlegungsnummer 87110601 (siehe nachfolgende Tabelle 4); K<sub>8</sub>18-27IV, ein spezifischer Antikörper für das Cytokeratin 18, hinterlegt bei der ECACC unter der Hinterlegungsnummer 8711301 (siehe nachfolgende Tabelle 5); K<sub>8</sub>18-9B1, ein spezifischer Antikörper für das Cytokeratin 18, hinterlegt bei der ECACC wie in Tabelle 6 angegeben und VIM 3B4, ein für Vimentin spezifischer Antikörper, der bei der ECACC hinterlegt ist unter der Hinterlegungsnummer 87110602 (siehe nachfolgende Tabelle 7).

Vorzugsweise werden durch kombinierte Anwendung der vier an sich bekannten Testverfahren Immunblot ("Western-Blot"), Dot-Blot, ELISA und Immunfluoreszenzmikroskopie geeignete Antikörper ausgewählt.

Dabei wird vorzugsweise wie folgt verfahren:

1. Immunblot ("Western-Blot" nach Towbin et al., (1979), Proc. Natl. Acad. Sci., USA 76, 435).

IF-Proteinstandards, das sind die alpha-helikalen Mittelstücke, zeigen nach elektrophoretischer Auftrennung auf Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE nach Lämmli, 1970, Nature 227,68) ein M<sub>r</sub> von ca. 38.000 bis 43.000. Nur solche Antikörper, die im Blot außer mit dem intakten Monomer des IF-Proteins auch mit dem Spaltstück positiv reagieren, werden ausgewählt. Für die Cytokeratine 8, 18 und 19 sind Immunblot-Reaktionen im Detail beschrieben in Franke et al., (1987), Exp.Cell Res., 173, 17-37, und in Hatzfeld et al. (1987) J. Mol. Biol. 197, 237-255.

II. Dot-Blot nach Franke et al. (1987), Exp.Cell Res. 173, 17-37.

Unter Pufferbedingungen (mit Zusatz von 4 M Harnstoff), welche die Bildung von Tetrameren und Protofilamenten begünstigen, werden die gereinigten IF-Proteine und nach bekannten Verfahren hergestellte  
 5 alpha-helikale Mittelstücke im Vergleich mit Überstandsfractionen auf Nitrozellulose aufgebracht und die Immunreaktion der Antikörper untersucht. Überstandsfractionen werden gewonnen, indem eine Gewebeprobe homogenisiert wird, das Homogenat mit einer Protease (zum Beispiel Chymotrypsin) inkubiert wird, nach einer bestimmten Inkubationszeit die Enzymaktivität gestoppt beziehungsweise das Enzym abgetrennt und das Homogenat zentrifugiert wird. Im Überstand befinden sich durch proteolytische Fragmentierung in  
 10 Lösung gegangene alpha-helikale Mittelstücke der IF-Proteine. Im Unterschied zum Immunblot-Verfahren ("Western-Blot") werden diese Fragment-Proteine beim Dot-Blot vor ihrer Immunreaktion nicht denaturiert, sondern reagieren mit dem jeweiligen Antikörper in einer ihrem nativen Zustand entsprechenden Anordnung der Polypeptid-Ketten.

15

### III. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Dieses bekannte Verfahren wird hier nur für IF-Proteine verwendet, die unter physiologischen Bedingungen löslich sind. Das sind in diesem Fall die als Standards präparierten alpha-helikalen Mittelstücke, gelöst  
 20 in Pufferlösung beziehungsweise Kontrollserum und anderen natürlichen Körperflüssigkeiten und in Überstandsfractionen nach Gewebe-Homogenisierung und -Verdauung. Bei diesem Test werden die IF-Fragmentproteine nicht denaturiert, sondern reagieren mit dem jeweiligen Antikörper in ihrem nativen Zustand.

### 25 IV. Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Von Geweben werden Gefrier-Dünnschnitte angefertigt, dabei werden die Zellen aufgebrochen und das Intermediärfilament- Netzwerk für Antikörper zugänglich gemacht. Die Immunreaktion findet daher am natürlichen Ort der Antigene, das sind hier die intakten Intermediärfilamentproteine, statt unter nicht  
 30 denaturierenden Bedingungen.

Vorzugsweise werden nur solche Antikörper, die nach allen unter I bis IV genannten Verfahren eindeutig positiv bewertet werden, in Verbindung mit der Erfindung eingesetzt.

Der Test erfolgt gegenüber dem Standard, weil dieser reproduzierbare und vergleichbare Bedingungen schafft, wie sie für die Beurteilung der getesteten Antikörper vorteilhaft sind.

35 Einen Standard gewinnt man vorzugsweise dadurch, daß aus dem entsprechenden Gewebe durch Extraktion und Reinigung die einzelnen IF-Proteine gewonnen werden.

Sollen Cytokeratin-Mittelstücke hergestellt werden, dann werden äquimolare Mengen aus einem basischen Cytokeratin und einem dem gleichen Gewebetyp zugeordneten sauren Cytokeratin in Harnstoff gelöst, und durch Herausdialysieren des Harnstoffs bilden sich zunächst die Tetramere.

40 Soll ein IF-Mittelstück gebildet werden, das nicht aus Cytokeratinen stammt, dann können aus dem gereinigten Protein gleichen Typs unmittelbar die Tetramere als Vorstufe zu Protofilamenten und Filamenten durch Rekonstitution gebildet werden.

In beiden Fällen werden dann durch kontrollierte Verdauung mit Protease, vorzugsweise Chymotrypsin, die alpha-helikalen Mittelstücke als Tetramere freigesetzt, dann isoliert und gereinigt und können dann als  
 45 Standard eingesetzt werden.

Die bei der Anwendung dieser Erfindung als Standards verwendeten alpha-helikalen Mittelstücke können durch Isolierung aus beliebigen Zell-Linien oder Geweben gewonnen werden, die IF-Proteine produzieren.

Die Rekonstitution der gereinigten Einzel-IF-Proteine kann beispielsweise unter Einsatz spezifisch  
 50 gereinigter, nichtkeratinöser IF-Proteine oder durch Kombination äquimolarer Mengen der Cytokeratine des sauren und des basischen Typs erfolgen, mit anschließendem Dialysieren der Tetramere gegen niedrigkonzentrierte Salzpuffer. Der Aufbau in Protofilamente und IFs kann zum Beispiel durch eine elektronenmikroskopische Analyse negativ gefärbter Proben nach Hatzfeld, M., et al., J. Cell Biol. 101:1826-1841 (1985), kontrolliert werden.

55 Die rekonstituierten IF-Proteine werden danach einer limitierten Proteolyse unterworfen, vorzugsweise unter Einsatz von Trypsin, Chymotrypsin oder Thrombin. Das Ausmaß des proteolytischen Abbaus kann durch Gel-Elektrophorese zur Maximierung des Anteils an Polypeptidfragmenten im Bereich von M<sub>r</sub> 38.000 bis 40.000 kontrolliert werden. Dann werden die alpha-helikalen Mittelstücke isoliert, vorzugsweise durch

Gel-Chromatografie oder eine HPLC mit Phasenumkehr.

Bei der Solubilisierung der zu identifizierenden oder der rekonstituierten IF-Proteine werden zunächst durch den proteolytischen Abbau die an den alpha-helikalen Mittelstücken hängenden Kopf- und Schwanzstücke abgeschnitten. Bei weiterer Einwirkung des proteolytischen Abbaus kann es zu einer einfachen  
 5 Teilung etwa in der Mitte der alpha-helikalen Mittelstücke kommen, da diese dort einen kurzen Abschnitt aufweisen, auf dem die alpha-helikale Struktur unterbrochen ist. Es fallen auf diese Weise durch einfache Teilung zwei Mittelstückfragmente von jedem Mittelstück an, von denen mindestens eines ein dem betreffenden Antikörper zugeordnetes Epitop trägt.

Für das Identifizierungsverfahren nach der Erfindung und die Standardisierung ist es nicht nachteilig  
 10 und verfälschend, wenn einige oder alle der alpha-helikalen Mittelstücke in dieser Weise einfach geteilt werden. Die Gesamtzahl der für die Antikörper zur Verfügung stehenden Epitope bleibt davon unberührt und damit auch die quantitativen Ergebnisse des Tests.

Man gewinnt auf diese Weise einen gewissen Toleranzspielraum bei der Solubilisierung, indem man diese so anlegt, daß mit Toleranzzugabe alle Mittelstücke isoliert und damit löslich sind, und hinnimmt, daß  
 15 durch die Toleranzzugabe einige oder alle Mittelstücke einfach geteilt sind.

Es werden deshalb vorzugsweise solche Antikörper eingesetzt, deren Epitope durch die einfache Teilung unbeeinflusst an jeweils einem dieser Mittelstückfragmente sitzen. Zur Quantifizierung der Identifikation genügt es, für die geteilten Mittelstücke die die Epitope aufweisenden Mittelstückfragmente mitzuzählen.

20 Als Antikörper werden vorzugsweise eingesetzt:

K<sub>s</sub> 8-17.2 zur Identifizierung eines alpha-helikalen Mittelstücks, von dem mindestens ein Monomer aus dem Cytokeratin No. 8 stammt,

K<sub>s</sub> 18-27 IV und/oder K<sub>s</sub> 18-9B1 zur Identifizierung eines alpha-helikalen Mittelstücks, von dem mindestens ein Monomer aus dem Cytokeratin No. 18 stammt,

25 K<sub>s</sub> 19.2 zur Identifizierung eines alpha-helikalen Mittelstücks, von dem mindestens ein Monomer aus dem Cytokeratin No. 19 stammt,

K<sub>s</sub> pan 1-8 zur Identifizierung eines alpha-helikalen Mittelstückes, von dem mindestens ein oder mehrere Monomere aus einem oder mehreren der Cytokeratine No. 1 bis 8 stammen, und/oder

VIM 3B4 zur Identifizierung eines alpha-helikalen Mittelstücks des Vimentins.

30 Diese Antikörper haben sich als eindeutig identifizierend erwiesen, wie weiter unten noch anhand der Beispiele näher dargelegt wird. Die genannten Antikörper werden nachfolgend beschrieben:

35

40

45

50

55

TABELLE 2

5	Monoklonaler Antikörper gegen Cytokeratine der basischen Cytokeratin-Unterfamilie (Nr. 1-8)	
10	Antikörper:	Der Antikörper K <sub>s</sub> pan 1-8 wird produziert von der Hybridom-Zelllinie K <sub>s</sub> pan 1-8. Die Hybridom-Zelllinie K <sub>s</sub> pan 1-8 ist hinterlegt am 19. Jan. 1988 unter ECACC 88011901.
15	Kategorie:	Monoklonaler Antikörper aus der Maus: Stamm BALB/c und Fusionspartner: Myeloma-Zelllinie X63-Ag8.653
20	Immunoglobulinklasse:	IgG2a
	Antigen:	Cytoskelettproteine aus kultivierten menschlichen MCF-7-Zellen.
25	Reagierendes Polypeptid:	Das den verschiedenen Cytokeratinen der basischen (Typ II) Unterfamilie (CK 1-8) gemeinsame Epitop
30	Reaktive Arten:	Mensch, Rind
35	Erkannte Strukturen, Antigene und Gewebe:	Alle Epithele einschl. beispielsweise Epidermis, Zahnfleisch, Zunge, Ösophagus, Hepatozyten und Gallengänge,

5		Dünndarm, Kolon, Vagina- und Cervixschleimhaut, Brustdrüsenepithel und Myoepithelien, retikuläres Epithel des Thymus, haarbildende Zellen und Haar.
10	Positive Reaktivität in kultivierten Zell-Linien:	MCF-7, RT-112, Detroit 562, RPMI 2650, HT-29, SCC-12 (alle menschlich); BMGE, MDBK (alle Rind)
15	Erkannte menschliche Tumore:	Alle bisher untersuchten Karzine einschl. Basaliom, Stachelzellenkarzinom der Epidermis, Plattenepithelkarzinom von Zunge, Ösophagus, Lunge und Cervix, Adenokarzinom von Lunge, Kolon und Cervix, Nierenzellenkarzinom, Mammakarzinom, Leberzellenkarzinom.
20		
25	Anwendung:	Pathologie (insb. Differentialdiagnose von Tumoren, auch zwischen verschiedenen Karzinomarten), Zelltypisierung in Produktion, Forschung.

30

TABELLE 3

## Monoklonaler Antikörper gegen Cytokeratin 19

35

Antikörper:

Der Antikörper K<sub>s</sub> 19.2 wird produziert von der Hybridom-Zelllinie K<sub>s</sub> 19.2. Die Hybridom-Zelllinie ist hinterlegt am 13. Nov. 1987 unter ECACC 87111302

40

Kategorie:

Monoklonaler Antikörper aus der Maus: Stamm BALB/c und Fusionspartner: Myeloma-Zelllinie NSO

45

Immunoglobulinklasse:

IgG2b

50

Antigen:

Cytoskelett aus kultivierten menschlichen MCF-7-Zellen

Reagierendes Polypeptid:

Ausschließlich Cytokeratin 19

55



(M<sub>r</sub> ungefähr = 43.000)

Reaktive Arten:

Mensch, Rind

5     Erkannte Strukturen,  
       Antigene und Gewebe:

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Nur mit bestimmten Epithelien reaktionsfähig. Positive Epithelien sind: Intestinal-schleimhaut, Gallengänge, Pankreas, Magenschleimhaut, Sammelwege von Niere, Ureter, Blasenurothel, Samenblase, Prostata, Mesothel, Eileiter, endometrisches Epithel, Endocervix, Bronchialepithel, Brustdrüse (Gangsystem, Acini) retikuläres Epithel des Thymus, Larynx- und Pharynx-Epithelien, Drüsenepithelien der Haut, Basal-Zellschichten einer Reihe geschichteter Epithelien (zum Beispiel Analepidermis, Vagina, Exocervix, Urethra, Ösophagus, Zungen- und Mundschleimhaut, Zahnfleisch). Negative Epithelien sind zum Beispiel: Epidermis der meisten Körperregionen, suprabasale Schichten in den meisten Stadien verschiedener mehrschichtiger Epithelien (zum Beispiel Exocervix, Vagina, Zunge, Ösophagus), Hepatozyten, azinöse Zellen des Pankreas, proximale Nierentubuli, Hoden, alle Mesenchym-Gewebe, die meisten Muskelgewebsarten, Neuralgewebe, Linsengewebe, Endothelien und andere Gefäßkomponenten.

Positive Reaktivität  
 in kultivierten menschlichen Zell-Linien:

MCF-7, HT-29, HeLa, RT-112,  
 Detroit 562, RPMI 2650, SSC-12

Erkannte menschliche  
 Tumore:

Adenokarzinome von Kolon,  
 Magen, Pankreas, Gallenblase,  
 Endometrium, Cervix, Cholangio-  
 karzinom der Leber, Nieren-  
 zellenkarzinom, Carcinoma  
 transitiocellulare der Blase,  
 Ovarialkarzinome, Platten-

epithelkarzinom der Cervix,  
Mesotheliom, Plattenepithel-  
karzinom von Bronchien und  
Lunge, großzelliges Karzinom  
der Lunge, kleinzelliges Kar-  
zinom der Lunge (intermediärer  
Typ), karzinoider Tumor der  
Bronchien, Brustkarzinom.

Anwendung: siehe Tabelle 2

#### Referenzliteratur:

1. Franke, W.W., et al., Cell Typing of Epithelia and Carci-  
nomas of the Female Genital Tract Using Cytoskeletal Pro-  
teins as Markers. Banbury Report 21:Viral Etiology of Cervi-  
cal Cancer. Cold Spring Harbor Laboratory; pp. 121 (1986)

2. Moll, R., et al., Cell 31:11-24 (1982)

#### TABELLE 4

Monoklonaler Antikörper gegen Cytokeratin 8

Antikörper: Der Antikörper K<sub>s</sub> 8-17.2 wird  
produziert von der Hybridom-  
Zelllinie K<sub>s</sub> 8-17.2. Die  
Hybridom-Zelllinie ist hinter-  
legt am 6. Nov. 1987 unter  
ECACC 87110601

Kategorie: Monoklonaler Antikörper aus  
der Maus: Stamm BALB/c und  
Fusionspartner: Myeloma-Zell-  
linie X63-Ag8.653

Immunglobulinklasse: IgG 1

Antigen: Cytoskelett aus MCF-7 Kultur-  
zellen (Human-Zelllinie)

Reagierendes Polypeptid: Ausschließlich Cytokeratin 8  
(M<sub>r</sub> ungefähr = 52.500)

Reaktive Arten: Mensch, Rind

Erkannte Strukturen,  
Antigene und Gewebe: Positive Epithelzellen schließen  
ein: Leber (Hepatozyten,  
Gallengänge), Darm, Drüsen-  
epithel der Zunge und alle  
einfachen Epithelien

Positive Reaktionen mit  
menschlichen Kulturzellen: MCF-7, HeLa, A-431

Erkannte menschliche  
Tumoren: Positive Karzinome schließen  
ein: Hepatozelluläres Karzinom,  
Adenokarzinom von Colon, Lunge,  
Brust.

Anwendung: wie in Tabelle 2.

# TABELLE 5

Monoklonaler Antikörper gegen Cytokeratin 18

Antikörper: Der Antikörper K<sub>s</sub> 18-27IV wird  
produziert von Hybridom-  
Zelllinie K<sub>s</sub> 18-27IV.  
Die Hybridom-Zelllinie K<sub>s</sub>  
18-27IV ist hinterlegt am  
13. Nov. 1987 unter  
ECACC 87111301

Kategorie: Monoklonaler Antikörper aus  
der Maus: Stamm BALB/c und  
Fusionspartner: Myeloma-Zell-  
linie SP2/OAg14

Immunglobulinklasse: IgG 1

Antigen: Cytoskelett aus MCF-7 Kultur-  
zellen

Reagierendes Polypeptid: Ausschließlich Cytokeratin 18  
(M<sub>r</sub> ungefähr = 45.000)

Reaktive Arten: Mensch, Rind

Erkannte Strukturen,  
Antigene und Gewebe: Positive Epithelien schließen  
ein: Cytokeratinfilamente in  
einschichtigen Epithelien und  
Drüsen, zum Beispiel in Leber  
(Hepatocyten, Gallengänge),  
Darm, Blase (Urothel); in mehr-  
schichtigen Epithelien (zum  
Beispiel Vagina, Zunge) nur  
bestimmte Zellen in der  
Basalzellschicht.

Erkannte menschliche  
Tumore:

Kolon-Karzinom, Brustkarzinom,  
Adenokarzinome verschiedener  
Organe.

Positive Reaktionen mit  
menschlichen Kulturzellen:

MCF-7, HeLa, A-431,  
Detroit 562, RT-112

Anwendung:

wie in Tabelle 2.

#### TABELLE 6

Monoklonaler Antikörper gegen Cytokeratin 18

Antikörper:

Der Antikörper K<sub>s</sub> 18-9B1 wird  
produziert von der Hybridom-  
Zelllinie K<sub>s</sub> 18-9B1. Die  
Hybridom-Zelllinie K<sub>s</sub> 18-9B1  
ist hinterlegt am 05. Jan. 1989  
unter ECACC 89010505

Kategorie:

Monoklonaler Antikörper aus der  
Maus: Stamm BALB/c und Fusions-  
partner: Myeloma-Zelllinie  
X63-Ag8.653

Immunglobulinklasse:

IgG1

Antigen:

Rekonstituierte Cytokeratine  
8:18 aus Rind (Kalbsleber)

Reagierendes Polypeptid:

Cytokeratin 18  
(M<sub>r</sub> ungefähr = 45.000)

Reaktive Arten:

Mensch, Rind

Erkannte Strukturen,  
Antigene und Gewebe:

Cytokeratinfilamente in ein-  
schichtigen Epithelien und  
Drüsen, z.B. in Leber (Hepato-  
cyten, Gallengänge), Darm  
(Epithel), Blase (Urothel) und  
in mehrschichtigen Epithelien  
(z.B. Vagina, Zunge) nur be-  
stimmte Zellen in der Basal-  
zellschicht.

Erkannte menschliche Tumore: Colonicarcinome, Mammacarcinome und deren Lymphknoten-Metastasen, Adenocarcinome verschiedener Organe

Positive Reaktionen mit menschlichen Kulturzellen: MCF-7, HeLa, A-431, Detroit 562, RT-112

Anwendung: wie in Tabelle 2.

#### TABELLE 7

##### Monoklonaler Antikörper gegen Vimentin

Antikörper: Der Antikörper VIM 3B4 wird produziert von der Hybridom-Zelllinie VIM 3B4. Die Hybridom-Zelllinie VIM 3B4 ist hinterlegt am 6. Nov. 1987 unter ECACC 87110602.

Kategorie: Monoklonaler Antikörper aus der Maus: Stamm BALB/c und Fusionspartner: Myeloma-Zelllinie X63-Ag8.653

Immunglobulinklasse: IgG 2a

Antigen: Aus Rinderlinsen gereinigtes Vimentin

Reagierendes Polypeptid: Spezifisch für Vimentin ( $M_r$  ungefähr = 57.000 auf SDS-PAGE)

Erkannte Arten (bis jetzt untersucht): Mensch, Rind, Nagetiere (Ratte, Maus, Hamster), Huhn, Amphibien (Xenopus)

Gewebespezifität: Alle Zellen, die mit Antiseren gegen Vimentin positiv waren, reagieren auch positiv mit dem Antikörper: Zellen mesenchymalen Ursprungs, auch Endothelzellen und bestimmte Zellen glatter Gefäßmuskulatur, Fibroblasten, Bindegewebe, alle Arten von Blutzellen, einschließlich Thymozyten, inter-

stitielle und Sertoli-Zellen des Hodens, Follikelzellen des Ovars; Koexpression von Vimentin mit anderen Intermediärfilamenten wird erkannt.

5

Positive Reaktionen mit getesteten Kulturzell-Linien:

RD Zellen, Glioma-Zellen, Fibroblasten (SV-80, 3T3), BHK

10

Erkannte menschliche Tumore:

Alle Vimentin exprimierenden Tumore, wie zum Beispiel Sarkome (einschließlich Myosarkome), Lymphome, Melanome etc.

15

Anwendung:

wie in Tabelle 2.

Zur Identifizierung der Neurofilamente und Gliafilamentproteine können Antiseren gegen Neurofilamentproteine (NF-8, im Handel beziehbar von Progen, Heidelberg, BRD) sowie Antikörper gegen Gliafilamentproteine (Meerschweinchen-Antiserum GF-100, Hybridom-Zell-Linie GF 12.24, im Handel beziehbar von Progen) verwendet werden. Ein weiterer Antikörper gegen Neurofilamentproteine ist von Boehringer Mannheim, BRD im Handel.

Ein bevorzugtes Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß alpha-helikale Mittelstücke in Körperflüssigkeiten, zum Beispiel Serum, immunologisch identifiziert werden durch Anwendung eines ELISA-Tests, daß dafür als an einer Titerplatte zu fixierende Fänger-Antikörper solche Antikörper nach Anspruch 1 eingesetzt werden, die mehrdeutig immunologisch reagieren, daß als Detektor-Antikörper solche Antikörper nach Anspruch 1 eingesetzt werden, die eindeutig immunologisch reagieren, und daß die mit der zu untersuchenden Lösung gewonnenen Titerergebnisse verglichen werden mit Titerergebnissen, die mit einer eingestellten Lösung eines Standards gewonnen wurden, welcher Standard nach Anspruch 2 oder 3 aus dem der zu untersuchenden Lösung entsprechenden Gewebetyp gewonnen wurde.

Durch die Anwendung eines mehrdeutigen Fänger-Antikörpers kann man ein und dieselbe Titerplatte für die Identifizierung verschiedener IF-Proteine einsetzen, indem eine eindeutige Identifizierung durch die Anwendung der eindeutigen Detektor-Antikörper erfolgt.

In diesem Sinne empfiehlt sich für Cytokeratine der  $K_{\text{pan}}$  1-8 als Fänger-Antikörper, weil dieser auf mindestens eines der in jedem Cytokeratin-Filament enthaltenen basischen Monomere der Cytokeratine 1 bis 8 gerichtet ist, so daß ausnahmslos alle Cytokeratine eingefangen werden, und dann aufgrund der damit gepaarten sauren Monomere 9 bis 19 von den spezifischen Detektor-Antikörpern identifiziert werden können, indem als Detektor-Antikörper für eines der Cytokeratine 1 bis 19 zum Beispiel die in den Tabellen 3 bis 6 beschriebenen Antikörper gegen Cytokeratin 8, 18 und 19 eingesetzt werden.

Die Detektor-Antikörper können durch Radioaktiva, Enzyme oder Fluoreszenzfarbstoffe markiert sein.

Zur Identifizierung von Antikörpern gegen IF-Proteine in einer Probe kann ein "Festphasentest" durchgeführt werden. Das Antigen, das heißt in diesem Fall das entsprechende IF-Protein, wird immobilisiert, mit der Probe inkubiert, gewaschen und der aus der Probe gebundene Antikörper identifiziert, zum Beispiel mit einem zweiten, markierten Antikörper.

Je nach der Gewebeprobe und der Art ihrer Vorbehandlung und der Durchführung des Tests wird man mehr oder weniger der tatsächlich vorhandenen IF-Proteine über ihre Mittelstücke identifizieren. Deshalb gibt unter Umständen die absolute Menge der gefundenen fremden, also nicht nativ zu dem untersuchten Gewebe gehörigen Mittelstücke keine erschöpfende Aussage. Eine bessere Aussage kann man dagegen erwarten, wenn man die gefundenen fremden IF-Proteine zu den für das betreffende Gewebe typischen, vorhandenen IF-Proteinen ins Verhältnis setzt. Das geschieht vorzugsweise dadurch, daß die in der Gewebeportion vorhandenen Intermediärfilamentproteine nach ihrem Ursprungsgewebe bestimmt und quantifiziert ermittelt werden, daß die gefundenen Mengen der der untersuchten Gewebeportion ursprungsmäßig zugeordneten Intermediärfilamentproteine zu der für die dem untersuchten Gewebe ursprungsmäßig zugeordneten Intermediärfilamentproteine gefundenen Menge ins Verhältnis gesetzt wird und daß dieses Verhältnis an einem nicht pathologischen Standard-Verhältnis gemessen wird.

Krebsherde sondern bestimmte Zellen ab, die sich bevorzugt in den nächstgelegenen Lymphknoten sammeln können (sogenannte Lymphknotenmetastasen). Diesen Umstand macht sich eine Weiterbildung

der Erfindung zunutze, die dadurch gekennzeichnet ist, daß zur Aufdeckung von kanzerogenen Herden eine Lymphgewebeportion untersucht wird und die Menge des gefundenen Vimentinproteins zur Menge der gefundenen, jeweils anderen Gewebetypen zugeordneten Intermediärfilamentproteine ins Verhältnis gesetzt wird.

- 5 Die nachstehenden Beispiele dienen der Veranschaulichung der Verfahren der vorliegenden Erfindung, ohne sie jedoch einzuschränken. Weitere geeignete Modifikationen und Adaptionen der Vielzahl von Konditionen und Parametern, die für den Fachmann offensichtlich sind, entsprechen dem Geist und dem Umfang der Erfindung.

## 10 BEISPIEL 1

### Verfahren zur Gewinnung eines Standards

- 15 Die angewendeten Methoden werden am Beispiel der Cytokeratine beschrieben; die Art der Aufarbeitung kann jedoch auf alle IF-Proteine übertragen werden.

#### 20 1.1. Reinigung der intakten Polypeptide

- Humancytokeratine (zum Beispiel 8, 18, und 19) wurden im wesentlichen wie bei Achtstaetter, T., et al., Methods Enzymol. 134:355-371 (1986), beschrieben, aus der Humankulturzelllinie MCF-7 gewonnen. Rinder-
- 25 cytotkeratine 8, 18 und 19 (zur Nomenklatur vergleiche Bader, B.L., et al., EMBO J. 5:1865-1875 (1986)), wurden aus Urothelzellen der Blase durch Abschaben der inneren Oberfläche von Rinderblasen gewonnen. Die abgeschabte Zellschicht wird homogenisiert (im wesentlichen beschrieben bei Achtstaetter T., et al., supra). Einzelne Cytokeratin-Polypeptide wurden mittels Anionen-Austauscher-Chromatografie auf DEAE-Zellulose (DE 52; Whatman Chemical Separation Inc., Clifton, NJ, USA) in einem 8 M Harnstoff-Puffer (8 M Harnstoff, 2,5 mM Dithioerythritol, 30 mM Tris-HCl (pH 8,0)) chromatografisch gereinigt, im wesentlichen
- 30 wie beschrieben bei Hatzfeld & Franke, 1985; Achtstaetter et al., 1986; Bader et al., 1986; Quinlan et al., 1986. Kurz beschrieben, wurde Cytoskelettmaterial für 2 Stunden in 9,5 M Harnstoff (5 mM Dithioerythritol, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)) extrahiert und der nach Zentrifugation bei 100.000 x g (g = Gravitationskonstante) erhaltene Überstandsextrakt wurde gegen einen 8 M Harnstoff-Puffer dialysiert und auf eine DEAE-Zellulosesäule, die mit diesem Puffer equilibriert wurde, aufgebracht. Gebundenes Protein wurde mit einem
- 35 0 bis 100 mM Guanidinium-HCl-Gradienten eluiert. Die Polypeptid-Zusammensetzung wurde durch eine SDS/Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) kontrolliert. Die vereinigten Fraktionen wurden einer weiteren Reinigung durch eine Hochdruck- Flüssig-Chromatografie mit Phasenumkehr unterworfen, wobei 0,01% (v/v) Trifluor-Essigsäure (TFA) (Fluka, Büchs, Schweiz) als wässriges Lösungsmittel A, 0,07% (v/v) TFA in Azetonitril (chromatografische Qualität, Merck Darmstadt, BRD) als organische Phase (Lösungsmittel B) und
- 40 eine BioRad-RP-304-Säule mit Phasenumkehr (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) verwendet wurden. Die Peakfraktionen wurden gesammelt, das Azetonitril durch Vakuumverdampfung entfernt und die Fraktionen gefriergetrocknet.

#### 45 1.2. Rekonstituierung der gereinigten Polypeptide zu Protofilamenten und IF-Proteinen

- Die gereinigten Cytokeratine wurden in Puffer, der 9,5 M Harnstoff enthält, gelöst. Äquimolare Mengen an Typ I und Typ II Cytokeratin wurden bei einer Endkonzentration von etwa 0,5 mg/ml gemischt, und die Protofilamente und IF-Proteine wurden erhalten, indem die Polypeptidlösung gegen Puffer niedriger
- 50 Ionenstärke dialysiert wurde. (Es wurden die Puffer, die bei Hatzfeld, M. und Franke, W.W., J. Cell. Biol. 101:1826-1841 (1985) beschrieben sind, verwendet.) Die Bildung von Protofilamenten und IF-Proteinen wurde elektronenmikroskopisch durch Negativ-Kontrastierung der Probe kontrolliert (vergleiche Hatzfeld M. und Franke, W.W., supra).

#### 55 1.3. Darstellung alpha-helikaler Cytokeratin-Mittelstücke durch limitierte Proteolyse

Der proteolytische Abbau wurde mit verschiedenen Proteasen durchgeführt. In einer typischen Präpara-

tion wurden Chymotrypsin (EC 3.4.21.1 aus Rinderpankreas, zum Beispiel von der Fa. Sigma, München) in einem Enzym-zu-Substrat-Verhältnis (Gewicht/Gewicht) von 6,6:1000 für das Cytokeratin 8:18 Paar und im Verhältnis 9:1000 für das Cytokeratin 8:19 Paar eingesetzt. Für jede Chymotrypsin-Charge mußte die Abbauprodukte kontrolliert und für den maximalen Anteil an stabförmigen Mittelstücken ( $M_r = 38.000 - 40.000$ ) optimiert werden. Das Optimum liegt bei zirka 20 min bei  $30^\circ \text{C}$ . Nach der entsprechenden Abbauprodukte wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von 5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid gestoppt.

#### 10 1.4. Reinigung der alpha-helikalen Mittelstücke

Die proteolytischen Mittelstücke und deren einfache Fragmente wurden entweder chromatografisch auf einer Sepharose CL6B Säule oder direkt über Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie getrennt, und zwar auf einer BioRad RP304-Säule mit Phasenumkehr unter Verwendung des im obigen Abschnitt 1 beschriebenen Lösungsmittelsystems. Zur weiteren Reinigung wurden die Hauptfraktionen mit Lösungsmittel A zur Reduzierung der Azetonitril-Konzentration auf ca. 20% (v/v) verdünnt und dann direkt auf eine My-Bondapak C18-Säule mit Phasenumkehr (Waters Associates, Milford, MA) aufgebracht. Alle Hauptfraktionen wurden lyophilisiert und die Proben mittels 1- und 2-dimensionaler Gelelektrophorese auf Anwesenheit der alpha-helikalen Mittelstücke untersucht. Die gereinigten alpha-helikalen Mittelstücke, die zum Teil einfach geteilt sind zu jeweils zwei Mittelstückfragmenten, da die Schnittstelle an einem kurzen mittleren Abschnitt, an dem die helikale Struktur unterbrochen ist, liegt, wurden als Referenzmaterial beziehungsweise Standard-Material für die Eichung des Nachweissystems und für Immunisierungen eingesetzt.

#### 25 BEISPIEL 2

##### Auswahl und Herstellung geeigneter Antikörper

Spezifische Antikörper gegen Intermediärfilamentproteine, sowohl eigene Entwicklungen als auch kommerziell erhältliche, wurden auf ihre Immunreaktivität mit den alpha-helikalen Mittelstückfragmenten, wie sie als Standard-Material nach BEISPIEL 1 gewonnen wurden, untersucht mit folgenden Methoden:

#### 35 2.1. Immunblot (Western-Blot; Reaktion mit denaturiertem Antigen)

Gereinigte Fragmentproteine (z.B. Cytokeratin 8:18-, Cytokeratin 8:19- oder Vimentin-Fragmente) und Cytoskelett-Präparationen aus Gewebeproben (z.B. Lymphknoten oder Leber) vor und nach proteolytischer Verdaureaktion mit Chymotrypsin (vergleiche Beispiel 3) wurden gelelektrophoretisch (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt, die Proteine elektrophoretisch auf Nitrozellulose transferiert und mit den in Frage kommenden spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Immunreaktion wurde über markiertes Protein A oder markierte Anti-Maus-Antikörper nachgewiesen. Antikörper, die mit den alpha-helikalen Mittelstücken ( $M_r 38000-40000$ ;  $M_r 20000-22000$  im Falle der basischen Keratine) eine Immunreaktion zeigten, wurden ausgewählt.

#### 2.2. Dot-Blot (Reaktion mit nativem bzw. renaturiertem Antigen)

Ca.  $2 \times 10^{-6}$  g gereinigte IF-Proteine (gelöst in  $50 \times 10^{-6}$  l 50mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7,4) bzw. Überstandsfractionen von homogenisierten Gewebeproben nach Chymotrypsinverdau werden direkt an Nitrozellulose gebunden (z.B. in einer SRC 96 Minifold I Dot-Blot-Apparatur von Schleicher u. Schuell, Dassel, BRD) und mit den in Frage kommenden, spezifischen Antikörpern inkubiert. Der weitere Arbeitsgang ist wie unter 1. beschrieben.

#### 2.3. ELISA (Reaktion mit nativem bzw. renaturiertem Antigen)



500 x 10<sup>-3</sup>g gereinigte Fragmentproteine (gelöst in 100 x 10<sup>-6</sup>l 50 mM NaHCO<sub>3</sub>-Puffer, pH 9,6) bzw. 2 x 10<sup>-5</sup>g (in 100 x 10<sup>-6</sup>l) Protein der Überstandsfraktionen von homogenisierten Gewebeproben nach Chymotrypsinverdau werden pro Vertiefung in einer 96-Loch Mikrotiterplatte inkubiert und gebundenes Protein mit den in Frage kommenden spezifischen Antikörpern inkubiert. Der weitere Arbeitsgang ist wie unter 1. beschrieben.

2.4. Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Standardmethode, eingehend beschrieben z.B. bei Ciocca D.R. und Bjercke R.J. (1986) in *Methods Enzymol.* 121, 562-579.

Antikörper, die nach den o.g. Methoden positiv waren, sind K<sub>s</sub> 19.2; K<sub>s</sub>18-9B1; K<sub>s</sub> 18-27 IV; K<sub>s</sub> 8-17.2; K<sub>s</sub> pan 1-8; VIM 3B4.

## 2.5. Herstellung monoklonaler, gegen alpha-helikale Mittelstücke gerichtete Antikörper

Zur Herstellung spezifischer Antikörper wurden nur in vitro rekonstituierte Filamente, die aus den jeweiligen gereinigten Polypeptiden gebildet wurden, zur Immunisierung injiziert. Um monoklonale Antikörper herzustellen, wurden weibliche, 6-8 Wochen alte BALB/c Mäuse immunisiert, indem ihnen Cytoskelett-Präparationen oder rekonstituierte Filamente mit 30-300 x 10<sup>-6</sup>g Protein pro Injektion injiziert wurden. Die Antigene wurden in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) suspendiert und für die erste Injektion mit Freund'schem Adjuvans (komplett) emulgiert. Bei allen folgenden Injektionen wurde Freund'sches Adjuvans (inkomplett) verwendet. Die Tiere wurden dreimal im Abstand von etwa drei Wochen subcutan gespritzt, und sie erhielten drei Tage vor der Zellfusion eine intraperitoneale Wiederholungs-Injektion mit 30-80 x 10<sup>-6</sup>g Antigen. Die Milzzellen immunisierter Mäuse wurden mit Maus-Myelomzellen der Linie Sp2/OAg14, X63-Ag8.653 und NSO/U (beschrieben wir bei Shulmann, M., et al., *Nature* 276:269-270 (1978); Kearney, I.F., et al., *J. Immunol.* 123:1548-1550 (1979); Clark and Milstein, *Somatic Cell Genetics* 7:657-666 (1981)) im Verhältnis 10:1 fusioniert, im wesentlichen wie es bei Koehler G. und Milstein C., *Nature* 256:495-497 (1975) beschrieben wurde. Die Hybridomüberstände wurden immunfluoreszenzmikroskopisch auf Gefrierschnitten von Human- und Rindergewebe (im wesentlichen beschrieben bei Achtstaetter T., et al., *Differentiation* 31:206-227 (1986)) oder auf Kulturzellen, die auf speziell beschichteten Objektträgern oder Deckgläsern gezüchtet wurden, getestet oder mit der Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstechnik (ELISA), wobei die gereinigten Antigene zum Beschichten von Mikrotiterplatten eingesetzt wurden. Positive Klone wurden zweimal durch kontrollierte Ausverdünnung subkloniert. Ig-Subklassen wurden nach Ouchterlony, O. und Nilsson, L.A. (1978, in: *Handbook of Experimental Immunology*; Weir, D.M., ed., vol. 1, chapter 19, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 1-19) bestimmt.

## 2.6. Koppeln der Detektor-Antikörper an Peroxidase.

Die als Detektor-Antikörper bezeichneten monoklonalen Antikörper wurden nach einem von B. Tijssen (*Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, vol. 15: Practice and theory of enzyme immunoassays, R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg, eds., Elsevier Amsterdam, New York, Oxford; S. 238) beschriebenen Verfahren an Peroxidase gekoppelt:

5 mg Peroxidase werden in 0,5 ml Natriumcarbonatpuffer 100 mM; pH 9,2) gelöst und zum Koppeln vorbereitet, indem das Enzym 2 Stunden bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluß mit 0,5 ml einer 10 mM NaIO<sub>4</sub>-Lösung oxidiert wird. Danach wird der gewünschte Antikörper (10 mg gelöst in 2 ml 100 mM Natriumcarbonatpuffer, pH 9,2) zugesetzt, 0,5 g trockenes Sephadex G-25 (Fa. Pharmacia, Freiburg) zugegeben und weitere 3 Stunden unter Lichtabschluß inkubiert. Das dabei entstandene Konjugat wird aus dem Sephadex-Material mit dem Natriumcarbonatpuffer eluiert und mit 1/20 Volumteil einer 0,5 % NaBH<sub>4</sub>-Lösung in 0,1 mM NaOH gemischt. 30 min. später wird 1/10 Volumteil der gleichen Lösung zugesetzt und 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Das Konjugat wird unter Vakuumdialyse gegen PBS dialysiert und auf ca. 0,5 ml konzentriert und anschließend auf einer Sephadex-G-200 (Fa. Pharmacia) Säule (1,0 x 50 cm) fraktioniert. Die Fraktionen (ca. 0,5 ml Volumen) werden auf ihren Anteil an Enzymaktivität und Antikörper getestet und die Fraktionen, die gleichzeitig hohe Ig-Konzentration und hohe Enzymaktivität aufweisen, zusammengefaßt.

BEISPIEL 3

## Nachweis und Bestimmung von Metastasen in Lymphgewebe

5

3.1. Solubilisierung von IF-Proteinen, vorzugsweise deren alpha-helikale Mittelstücke

Es wird zunächst das Feuchtgewicht des Lymphknotengewebes ermittelt. Das Gewebe wird im dreifachen Volumen - bezogen auf das Feuchtgewicht - einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) (10 mM Natriumphosphat pH 7,4, 150 mM Natriumchlorid) mit Hilfe eines Messerhomogenisators bis zur breiartigen Konsistenz zerkleinert (es wird der Einsatz eines Polytron-Homogenisators der Firma Kinematica, Luzern/Schweiz empfohlen). Das Homogenat wird mit Chymotrypsin inkubiert.

Zu diesem Zweck wird Chymotrypsin verwendet, das zuvor an eine Matrix (CNBr-aktivierte Sepharose 4B, Fa. Pharmacia, Freiburg) gebunden worden ist: 1 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B werden 15 min in 1M HCl gequollen (Gelvolumen ca. 3,5 ml/g) und mit insgesamt 200 ml 1M HCl gewaschen. Die Salzsäurelösung wird abgesaugt und das Matrixmaterial mit 5 ml Kopplungspuffer (0,5 M NaCl, 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0) gewaschen. 10 mg Chymotrypsin werden in 5 ml Kopplungspuffer gelöst und mit dem Matrixmaterial in Kopplungspuffer 2 Stunden bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung inkubiert. Verbliebene, nicht abgesättigte Kopplungsstellen werden danach durch Zusatz von 5 ml 0,2 M Glycinlösung (pH 8,0) blockiert. Anschließend wird das Gelmaterial mit einem Überschuß an Kopplungspuffer (ca. 50 ml) und 10 ml Acetatpuffer (0,5 M NaCl, 0,1 M Natriumacetat, pH 4,0) gewaschen. Unter diesen Bedingungen werden ca. 60 % des eingesetzten Chymotrypsins gebunden, das heißt das Sepharose 4B-Gel enthält 1,7 mg/ml gekoppeltes Chymotrypsin. Zur besseren Handhabung wird das Gel zweifach in PBS verdünnt (Chymotrypsin-Konzentration 0,85 mg/ml).

Dem Gewebebrei wird Chymotrypsin (EC 3.4.21.1 aus Rinderpankreas, zum Beispiel von der Fa. Sigma, München) im Verhältnis 1:1000 (berechnet auf das Feuchtgewicht des Gewebes) zugesetzt. Es folgt ein Inkubationsschritt bei 30 °C (vorzugsweise im Thermoblock, eventuell im Wasserbad). Durch Einstellen des Homogenats in Eis für 5 min wird die Abdaureaktion nach 30 min gestoppt. Das Homogenat wird 30 min bei  $2 \times 10^4$  g zentrifugiert und der Zentrifugationsüberstand sofort abgenommen; das gekoppelte Chymotrypsin befindet sich im Sediment.

Unter diesen Bedingungen werden 80 bis 95 Gewichtsprozent des Materials der alpha-helikalen Mittelstücke in noch identifizierbarem Zustand aus den IF-Proteinen in die Überstandsfraktion freigesetzt und einige intakte IF-Proteine befinden sich ebenfalls in einem löslichen Stadium.

35

3.2. Ermittlung und Bestimmung des Vimentingehaltes

Im zentrifugierten Überstand wird Vimentin immunologisch durch einen Sandwich-ELISA bestimmt. Hierzu dient ein erstes Anti-Serum, GP-8, als Fänger-Antikörper, die gegen das alpha-helikale Mittelstück gerichtet sind, und ein zweiter monoklonaler Antikörper VIM-3B4 als Detektor-Antikörper, der gegen ein anderes Epitop des alpha-helikalen Mittelstückes, das von den ersten Epitopen unabhängig und verschieden ist, gerichtet ist. Der Fänger-Antikörper (GP8) wird in einer Konzentration von  $10 \times 10^{-6}$  g/ml, gelöst in 50 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 9,6), auf Mikrotiterplatten beschichtet ( $150 \times 10^{-6}$  l pro Vertiefung). Für die Standardkurve wird gereinigtes Vimentin-Fragment in Konzentrationen von 10 ng/ml bis 500 ng/ml (gelöst in Puffer: 150 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4, 0,05% Tween 20) verwendet. Zur Messung der Vimentinkonzentration im zentrifugierten Überstand wird dieser 1:100 bis 1:500 mit dem letztgenannten Puffer verdünnt. Der mit Peroxidase markierte Detektor-Antikörper VIM 3B4 wird mit Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4, 1% Rinderserumalbumin, 0,05% Tween 20) auf eine Konzentration von  $0,5 \times 10^{-6}$  g/ml verdünnt und mit  $150 \times 10^{-6}$  l pro Vertiefung eingesetzt. Als Substrat wird o-Phenylendiamin oder ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonat (6) ) verwendet. Der so erhaltene Vimentinwert dient dann als Bezugsgröße für die quantitative Auswertung der weiteren Meßergebnisse.

3.3. Bestimmung der Cytokeratine und Ermittlung der Cytokeratingehalte

Im zentrifugierten Überstand werden die vorhandenen Cytokeratine immunologisch durch einen Sandwich-ELISA bestimmt. Hierzu dient ein erster monoklonaler Antikörper K<sub>8</sub> pan 1-8, der sogenannte

- Fänger-Antikörper, der gegen ein erstes, für die Cytokeratine 1 bis 8 typisches Epitop gerichtet ist. Der Fänger-Antikörper  $K_s$  pan 1-8 wird in einer Konzentration von  $20 \times 10^{-6}$  g/ml, gelöst in 50 mM  $\text{NaHCO}_3$  (pH 9,6), auf Mikrotiterplatten beschichtet ( $150 \times 10^{-6}$  l pro Vertiefung). Für die Standardkurve werden z.B. die gereinigten Cytokeratin-Fragmente in den Kombinationen Cytokeratin 8:18 und 8:19 in Konzentrationen von 5 ng/ml bis 500 ng/ml (gelöst in Puffer: 150 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4, 0,05% Tween 20) verwendet. Als Peroxidase-gekoppelte Detektor-Antikörper werden z.B.  $K_s$  18-27 IV und  $K_s$  18-9B1 (für Cytokeratin 18 Fragmente),  $K_s$  19.2 (für Cytokeratin 19 Fragmente) und  $K_s$  8-17.2 (für Cytokeratin 8 Fragmente) eingesetzt. Zur Messung der Cytokeratin-Konzentration im zentrifugierten Überstand wird dieser 1:100 mit Puffer (150 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4, 0,05 % Tween 20) verdünnt.
- Zur Standardisierung werden bekannte Mengen des nach BEISPIEL 1 gewonnenen Cytokeratin-Standards dem Sandwich-ELISA unterworfen. Die Enzymaktivität, die der Konzentration eines jeden standardisierten Cytokeratins entspricht, wird gegen die Konzentration aufgetragen, um eine Standard-Kurve zu erhalten, von der die Konzentration unbekannter Mengen eines jeden Cytokeratins interpoliert werden kann.
- Das Ausmaß von Karzinom-Metastasen kann ausgedrückt werden durch das Verhältnis des bestimmten Cytokeratins und des gemessenen Vimentins in der Gewebeprobe.

#### BEISPIEL 4

##### Quantitative Bestimmung von Cytokeratin 8:19 im Sandwich-ELISA auf Mikrotiterplatten

#### 4.1. Beschichten der Mikrotiterplatten

In jede Vertiefung werden  $2 \times 10^{-6}$  g Fänger-Antikörper  $K_s$  pan 1-8 (gelöst in  $100 - 150 \times 10^{-6}$  l 50 mM Natriumcarbonatpuffer pH 9,6) pipettiert. Die Platte wird abgedeckt und über Nacht bei  $4^\circ \text{C}$  inkubiert.

#### 4.2. Waschen und Blockieren

Die überschüssige Antikörperlösung aus jeder Vertiefung wird durch Absaugen entfernt. In jede Vertiefung werden 3 x hintereinander  $200 \times 10^{-6}$  l Waschpuffer (PBS-Tween: 150 mM NaCl, 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 0,05% Tween 20) pipettiert und durch Umdrehen der Platte entfernt. Restfeuchtigkeit wird durch leichtes Ausklopfen der Platte auf mehrere Lagen Papierhandtücher entfernt. Jede Vertiefung wird mit  $200 \times 10^{-6}$  l Abblockpuffer (150 mM NaCl, 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 0,05% Tween 20, 1% Rinderserumalbumin, 5% Saccharose; bei längerer Aufbewahrungszeit werden außerdem 0,01% Thimerosal zugefügt) gefüllt und mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 4.3. Inkubieren mit Antigen bzw. Serumproben

Standardprotein des Cytokeratin 8:19, gewonnen nach BEISPIEL 1 in Konzentrationen zwischen 5 ng/ml und 500 ng/ml (abhängig vom jeweiligen Detektor-Antikörper) wird in Kontrollserum (Monitrol von Merz & Dade oder Kontrollogen L und LU von Behring) aufgenommen. Das Kontrollserum wird ebenfalls in Abhängigkeit vom Detektor-Antikörper in Verdünnung von 1:10 bis 1:100 eingesetzt. Je Vertiefung werden  $100 \times 10^{-6}$  l Standardproteinlösung oder Serumproben (1:10 bis 1:100 verdünnt) pipettiert und 90 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird 4 x mit  $200 \times 10^{-6}$  l Waschpuffer (PBS-Tween, wie oben angegeben) gewaschen.

#### 4.4. Inkubation mit Detektor-Antikörper

Mit Peroxidase gekoppelter Detektor-Antikörper  $K_s$  19.2 wird in Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 1% Rinderserumalbumin) verdünnt (die optimale Konzentration liegt bei 0,2 - 0,5 U/ml), davon in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte  $100 \times 10^{-6}$  l pipettiert und 90 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird 2 x mit  $200 \times 10^{-6}$  l Waschpuffer (PBS-Tween, wie oben angegeben) und 4 x

unter fließendem Wasser gewaschen.

#### 4.5. Substratreaktion

5 Für eine Mikrotiterplatte wird 1 Substratablette (10 mg) o-Phenylendiamin (Fa. Sigma) und  $10 \times 10^{-6}$  l 30%  $H_2O_2$  entweder in 10 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,0) oder in Citrat-Phosphat-Puffer (0,0347 M Citronensäure, 0,0667 M di-Natriumhydrogenphosphat; pH 5,0) gelöst (bei Verwendung von Citrat-Phosphat-Puffer erhält man höhere Absorptionen). In jede Vertiefung werden  $100 \times 10^{-6}$  l Substratlösung  
10 (auf Raumtemperatur temperiert) pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird abgedeckt, um die Reaktion vor Lichteinwirkung zu schützen mit Alufolie o.ä.) und solange inkubiert (15-30 min.), bis sich eine entsprechende Farbintensität entwickelt hat.

#### 15 4.6. Abstoppen der Enzymreaktion

Durch Zugabe von  $50 \times 10^{-6}$  l 12,5%iger  $H_2SO_4$ -Lösung wird die Reaktion der Peroxidase gestoppt. Bei quantitativen Bestimmungen ist zu beachten, daß für Standardprotein und Testserum nach der gleichen Zeit abgestoppt wird.

20

#### 4.7. Auswertung

Die Mikrotiterplatten werden bei 492 nm in einem ELISA-Photometer durchgemessen.

25

### BEISPIEL 5

#### 30 Quantitative Bestimmung von Cytokeratin 8:18 im Sandwich-ELISA mit Mikrotiterplatten

5.1. Anstelle des Detektor-Antikörpers  $K_5$  19.2 wird der Peroxidase-gekoppelte Antikörper  $K_5$  18-27.IV oder  $K_5$  18-9B1 (gegen das Cytokeratin 18-Fragment gerichtet) eingesetzt. Sonst wie BEISPIEL 4.

5.2. Als Detektor wird der Peroxidase-gekoppelte Antikörper  $K_5$  8-17.2 (gegen das Cytokeratin 8-  
35 Fragment gerichtet) eingesetzt. Sonst wie BEISPIEL 4.

### Ansprüche

40 1. Verfahren zur Identifizierung des Differenzierungszustandes und des Ursprungs einer Zellgewebsprobe oder von Zellgewebstrümmern in Körperflüssigkeit durch Solubilisierung der in dieser Probe beziehungsweise Körperflüssigkeit vorhandenen unlöslichen Intermediärfilamentproteine in Form von löslichen Fragmenten, vorzugsweise der alpha-helikalen Mittelstücke, und Identifizierung dieser so erhaltenen oder bereits ohne zusätzliche Aufbereitung in der Probe enthaltenen Fragmente nach ihrem Ursprungsgewebetyp  
45 durch Immunreaktion mit spezifischen Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß als Antikörper solche eingesetzt werden, die zur Identifizierung - vorzugsweise zur eindeutigen Identifizierung - von Intermediärfilamentproteinen nach ihrem Ursprungsgewebetyp geeignet sind und außerdem nach mehreren verschiedenen bekannten Testverfahren mit dem alpha-helikalen Mittelstück - beziehungsweise einem Epitop-tragenden Fragment davon - eines durch Rekonstitution aus gereinigten  
50 Monomeren des jeweils betreffenden Intermediärfilamentproteins gewonnenen Standards immunologisch reagieren.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Standard aus den zu identifizierenden Mittelstücken beziehungsweise Epitop-tragenden Fragmenten hergestellt wird, indem aus dem entsprechenden Gewebe oder einer geeigneten Zellkultur-Linie durch  
55 Extraktion und Reinigung die einzelnen Cytoskelett-Polypeptide isoliert werden, daß dann aus diesen Polypeptiden beziehungsweise im Falle der Cytokeratine aus einem äquimolaren Gemisch von Polypeptiden der relativ basischen (Typ II) und der sauren (Typ I) Unterfamilien als nächste Untereinheiten Dimere, sodann Tetramere und schließlich Protofilamente gebildet werden, und

daß dann durch kontrollierte Verdauung mit Protease die alpha-helikalen Mittelstücke dieser Intermediärfilamente als dimere oder tetramere Komplexe freigesetzt, isoliert und gereinigt und als Standard eingesetzt werden.

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,  
 5 daß die proteolytische Solubilisierung der zu identifizierenden Intermediärfilamentproteine bis maximal zur einfachen Teilung der alpha-helikalen Mittelstücke in jeweils zwei Mittelstückfragmente erfolgt, daß solche Antikörper eingesetzt werden, deren Epitope durch die einfache Teilung unbeeinflußt an mindestens einem dieser Mittelstückfragmente sitzen und  
 10 daß zur Quantifizierung der alpha-helikalen Mittelstücke die Zahl der diese Epitope aufweisenden Mittelstückfragmente bestimmt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet,  
 daß die Solubilisierung mit Protease im Enzym-zu-Substrat-Verhältnis und einer Abbaupzeit erfolgt, die derart bemessen sind, daß von allen zu identifizierenden Intermediärfilamentprotein-Typen die alpha-helikalen Mittelstücke beziehungsweise Epitop-tragende Fragmente davon freigesetzt sind.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,  
 daß als Antikörper eingesetzt werden:  
 K<sub>5</sub> 8-17.2 zur Identifizierung eines alpha-helikalen Mittelstücks, von dem mindestens ein Monomer aus dem Cytokeratin No. 8 stammt,  
 K<sub>5</sub> 18-27 IV und/oder K<sub>5</sub> 18-9B1 zur Identifizierung eines alpha-helikalen Mittelstücks, von dem mindestens  
 20 ein Monomer aus dem Cytokeratin No. 18 stammt,  
 K<sub>5</sub> 19.2 zur Identifizierung eines alpha-helikalen Mittelstücks, von dem mindestens ein Monomer aus dem Cytokeratin No. 19 stammt,  
 K<sub>5</sub> pan 1-8 zur Identifizierung eines alpha-helikalen Mittelstückes, von dem mindestens ein oder mehrere Monomere aus einem oder mehreren der Cytokeratine No. 1 bis 8 stammen, und  
 25 VIM 3B4 zur Identifizierung eines alpha-helikalen Mittelstücks des Vimentins.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,  
 daß alpha-helikale Mittelstücke oder deren Epitop-tragende Fragmente immunologisch durch Anwendung eines ELISA-Tests identifiziert werden,  
 daß dafür als an einer Mikro-Titerplatte zu fixierende Fänger-Antikörper solche Antikörper nach Anspruch 1  
 30 eingesetzt werden, die entweder aus Tierseren beziehungsweise als monoklonale Antikörper mittels der Hybridoma-Technik gewonnen wurden und mit mehreren Epitopen beziehungsweise mit einem in mehreren Cytokeratinen vorkommenden Epitop reagieren,  
 daß als Detektor-Antikörper solche Antikörper nach Anspruch 1 eingesetzt werden, die eindeutig mit nur einem Intermediär-Filament-Polypeptid reagieren, und  
 35 daß die mit der zu untersuchenden Lösung gewonnenen Titerergebnisse mit Titerergebnissen verglichen werden, die mit einer eingestellten Lösung eines Standards gewonnen wurden, welcher Standard nach Anspruch 2 gewonnen wurde.

7. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,  
 daß als Fänger-Antikörper für Cytokeratine Antikörper K<sub>5</sub> pan 1-8 eingesetzt wird, der mit einem der  
 40 Cytokeratine 1 bis 8 aus der Gruppe der Cytokeratine 1 bis 19 reagiert.

8. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet,  
 daß als Detektor-Antikörper eingesetzt werden:  
 K<sub>5</sub> 8-17.2 für das Cytokeratin No. 8,  
 K<sub>5</sub> 18-27 IV oder K<sub>5</sub> 18-9B1 für das Cytokeratin No. 18,  
 45 K<sub>5</sub> 19.2 für das Cytokeratin No. 19, und/oder  
 VIM 3B4 für Vimentin.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,  
 daß die zu untersuchende Probe eine Körperflüssigkeit aus der Gruppe bestehend aus Blut, Blutserum, Cerebrospinalliquor, Urin, Fruchtwasserpunktat oder Punktaten anderer Körperhöhlen wie der Pleura oder  
 50 des Peritonealraumes ist, und die darin gelösten Cytoskelettprotein-Fragmente nachgewiesen und bestimmt werden.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet,  
 daß eine zu untersuchende Gewebsprobe entnommen und zu einem Gewebeprei beziehungsweise einem Homogenat verarbeitet wird,  
 55 daß dann diese Gewebsprobe proteolytischem Abbau unterzogen wird unter Einsatz von Protease,  
 daß der Ansatz dann zentrifugiert und  
 daß der Überstand des Zentrifugats auf die Anwesenheit und den Gehalt an alpha-helikalen Mittelstücken oder Epitop-tragenden Fragmenten davon untersucht wird.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die in der Gewebeportion vorhandenen Intermediärfilamentproteine nach ihrem Ursprungsgewebe sortiert und quantifiziert ermittelt werden, daß die gefundenen Mengen der der untersuchten Gewebepor tion ursprungsmäßig nicht zugeordneten Intermediärfilamentproteine zu der für die dem untersuchten Gewebe ursprungsmäßig zugeordneten Intermediärfilamentproteine gefundene Menge ins Verhältnis gesetzt wird, und daß dieses Verhältnis an einem nicht pathologischen Standard-Verhältnis gemessen wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß zur Aufdeckung von Tumorgewebe eine Lymphknotengewebeportion untersucht wird und die Menge des gefundenen Vimentins zur Menge der gefundenen, jeweils anderen Gewebetypen zugeordneten Intermediärfilamentproteine ins Verhältnis gesetzt wird.

13. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß eine Probe ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Biopsiematerial von Epithel- und Knochenmarksgewebe untersucht wird.

14. Hybridoma-Zelllinie aus dem Maus-Stamm BALB/c und dem Fusionspartner Myeloma-Zelllinie X 63-Ag8.653, SP2/OAg14 und NSO/U und wie unter ECACC 88011901 am 19. Januar 1988, ECACC 87111302 am 13. November 1987, ECACC 87110601 am 06. November 1987, ECACC 87111301 am 13. November 1987, ECACC 87110602 am 06. November 1987 und unter ECACC 89010505 am 05. Januar 1989 hinterlegt.

15. Antikörper der Immunglobulinklasse IgG2a, der mit dem den verschiedenen Cytokeratinen der basischen (Typ II) Unterfamilie (CK 1-8) gemeinsamen Epitop als Antigen reagiert und der von der unter ECACC 88011901 hinterlegten Zelllinie produziert wird.

16. Antikörper der Immunglobulinklasse IgG2b, der mit dem Cytokeratin 19 als Antigen reagiert und der von der unter ECACC 87111302 hinterlegten Zelllinie produziert wird.

17. Antikörper der Immunglobulinklasse IgG 1, der mit dem Cytokeratin 8 als Antigen reagiert und der von der unter ECACC 87110601 hinterlegten Zelllinie produziert wird.

18. Antikörper der Immunglobulinklasse IgG 1, der mit Cytokeratin 18 als Antigen reagiert und der von der unter ECACC 87111301 oder von der unter ECACC 89010505 hinterlegten Zelllinie produziert wird.

19. Antikörper der Immunglobulinklasse IgG 2a, der mit Vimentin als Antigen reagiert und der von der unter ECACC 87110602 hinterlegten Zelllinie produziert wird.

20. Verfahren zum Auffinden des Ursprungs eines Gewebes Schadens, dadurch gekennzeichnet, daß ein Testpräparat aus den gereinigten, für das entsprechende Gewebe typischen Polypeptiden beziehungsweise Fragmenten davon gebildet wird, den in einer Körperflüssigkeit - aus der Gruppe Blut, Blutserum, Punktat oder eine andere Körperflüssigkeit - möglicherweise enthaltenen Antikörpern ausgesetzt wird und daß die Qualität und Quantität der an diese Testsubstanzen gebundenen Antikörper bestimmt wird.



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
X,P L	EP-A-0 267 355 (PROGEN BIOTECHNIK GmbH) * Insgesamt * ---	1,2,5-20	G 01 N 33/68 G 01 N 33/574 G 01 N 33/577 C 12 P 21/00
X,P L	EP-A-0 267 356 (PROGEN BIOTECHNIK GmbH) * Insgesamt * ---	1,2,5-20	
X,D	WO-A-8 503 132 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) * Seite 4, Zeilen 19-27; Seite 5, Zeile 32 - Seite 9, Zeile 19; Seite 10, Zeile 16 - Seite 11, Zeile 24; Seite 26, Zeile 1 - Seite 30, Zeile 12 * ---	1,2,5-11,13-20	
Y	EP-A-0 163 304 (SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) * Seite 3, Zeile 9 - Seite 4, Zeile 32; Seite 9, Zeile 10 - Seite 17, Zeile 25; Ansprüche 1-15 * ---	1-11,13-20	
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 95, 1981, Seite 302, Nr. 37953a, Columbus, Ohio, US; W.J. NELSON et al.: "Properties of a calcium ion-activated protoase specific for the intermediate-sized filament protein vimentin in Ehrlich ascites tumor cells", & EUR. J. BIOCHEM. 1981, 116(1), 51-7 * Insgesamt * ---	1-11,13-20	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4) G 01 N C 12 P
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 02-06-1989	Prüfer VAN BOHEMEN C.G.
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
Y	JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, Band 85, 1985, Seiten 401-407, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, NL; G.K. HANSSON: "Solid-phase preparation of vimentin-type intermediate filaments for immunoassays" * Insgesamt * ---	1,2,5,9 -14,19, 20	
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 96, 1982, Seite 498, Nr. 159850f, Columbus, Ohio, US; I. VIRTANEN et al.: "Low-ionic strenght induces degradation ofvimentin in cultured human fibroblasts", & BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 1982, 105(2), 730-6 * Insgesamt * ---	1,2,5,9 -14,19, 20	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 96, 1982, Seite 458, Nr. 101416c, Columbus, Ohio, US; P. TRAUB et al.: "Occurrence in various mammalian cells and tissues of the calcium(2+)-activated protease specific for the intermediate-sized filament proteins vimentin and desmin", & EUR. J. CELL. BIOL. 1981, 26(1), 61-7 * Insgesamt * -----	3,4,10	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
Recherchesort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 02-06-1989	Prüfer VAN BOHEMEN C.G.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument ..... & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	